

AI

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-319294

(43)Date of publication of application : 21.11.2000

(51)Int.Cl.

C07K 1/34

C07K 16/06

(21)Application number : 11-130528

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 11.05.1999

(72)Inventor : HIGUCHI AKON  
YOKOKI MASANOBU

## (54) PURIFICATION OF SOLUTION OF POLYMER ORIGINATING FROM ORGANISM

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To purify the subject organism-originating polymer that is useful in the fields of medicines and medical treatment in high filtration efficiency, as the contaminants in the polymer solution, for example, viruses or the like are effectively removed by reducing the concentration of DNA or the like in the organism-originating polymer solution to be filtered before the membrane filtration.

SOLUTION: After the concentration of DNA and/or RNA in the organism- originating polymer solution to be filtered is reduced, preferably to  $\leq 5$  ppb, the polymer solution is subjected to the membrane filtration with an ultrafiltration membrane made of cellulose or the like to purify the objective solution. In a preferred embodiment, viruses are removed by this filtration. The concentration of the DNA and/or the RNA is reduced by the membrane filtration. As an organism-originating polymer solution, are cited preferably a  $\gamma$ -globulin solution of 3-8% concentration.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

01.05.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-319294

(P2000-319294A)

(43) 公開日 平成12年11月21日 (2000.11.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース*(参考)
C 0 7 K 1/34		C 0 7 K 1/34	4 H 0 4 5
16/06		16/06	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平11-130528	(71) 出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成11年5月11日 (1999.5.11)	(72) 発明者	樋口 亜紺 神奈川県川崎市麻生区上麻生1235
		(72) 発明者	横木 正信 東京都千代田区神田美土代町9番地1 旭化成工業株式会社内
		(74) 代理人	100090941 弁理士 藤野 清也
		Fターム(参考)	4H045 AA20 DA15 DA31 DA65 DA66 DA75 GA10 GA23

(54) 【発明の名称】 生物由来高分子溶液精製方法

(57) 【要約】

【課題】 生物由来高分子溶液から濾過により、ウィルス等の不純物を除去するに際し、従来の方法と比較して、濾過効率、すなわち濾過速度及び透過率が高い方法を提供する。

【解決手段】 生物由来高分子溶液を膜により濾過する際に、濾過すべき溶液中のDNA及び/またはRNAの濃度を予め低減せしめた後に濾過する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 滲過すべき生物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの濃度を低減させた後、膜滲過することを特徴とする生物由来高分子溶液精製方法。

【請求項2】 滲過すべき生物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの濃度が5ppb以下である請求項1記載の生物由来高分子溶液精製方法。

【請求項3】 滲過により除去すべき対象がウイルスである請求項1または請求項2に記載の生物由来高分子溶液精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医薬・医療の分野において用いられる生物由来高分子溶液の精製方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】医薬・医療の分野で、タンパク質などの生物由来高分子に不純物が混入した場合には、ウイルス性肝炎等の疾病に罹患する恐れがある(K. Yamaguchi et al. J. Electron. Microsc. 40, 337(1991))。よって、不純物、特に感染性ウイルスが不活化ないし除去された安全性の高い生物由来高分子が希求されている。不純物を実質的に含まない生物由来高分子を得る方法としては、その製造段階で該生物由来高分子を含む溶液を加熱処理、放射線照射、クロマトグラフ処理、溶剤及び界面活性剤による処理（いわゆるSD法）、膜分離で処理する方法等がある(S. Harada et al. J. Clin. Microbiol., 22, 908 (1985))。

【0003】しかし、膜分離を除く上記の方法は目的とする生物由来高分子を変性・失活させて回収率の低下、変性物による危険性の増加を招いたり、不活化のために加えた界面活性剤等の薬品の除去ないしは無害化が容易でなかったり、不純物の十分な除去効果が得られないなどの問題点を有している。

【0004】一方、膜分離法は、膜構造中に存在する細孔と通過すべき粒子（例えば有用タンパク質）ないしは阻止すべき粒子（例えばウイルス）の相対的な大きさの差により、物理的に、これら粒子を分離し、結果的に不純物を除去する、いわゆるsize exclusion原理によっており、変性・失活の恐れがなく、また不活化のために薬品を添加することもないのでその除去・無害化も不要である。このため、膜分離が、医薬・医療の分野における生物由来高分子溶液の精製の用途として広がってきている。

【0005】しかし、size exclusion原理によれば、除去対象粒子としての不純物の効果的除去と、回収対象粒子としての生物由来高分子の効率的な膜透過・回収は二律背反の現象となりがちである。すなわち、除去対象粒子の除去を効果的ならしめようとして膜の細孔の大きさを小さく設定すると、回収対象粒子の膜透過が抑制さ

れ、滲過効率すなわち、滲過速度及び透過率（ふるい係数）が低下する。一方、回収対象粒子の膜透過・回収を効率的ならしめようと膜の細孔の大きさを大きく設定すると、除去対象粒子の除去効果を犠牲にすることになる。また、一般に滲過時間の経過に従って、滲過効率を示すこれらのパラメーターは悪化してくる。その理由は、滲過の継続に従って、溶質による細孔の閉塞が発生するためである。この点においても、粒子の大きさと細孔の大きさの相対的關係が影響を及ぼす。不純物の高い除去効果を維持しながら、短時間で、高い透過率で回収対象粒子としての生物由来高分子を滲過しようとするれば、膜面積の増大が必要となり、精製コストが増大する。

【0006】これらの問題を解決する手段として、膜による分離すなわち滲過に供する前段階で、通過すべき粒子の大きさを減ずる方法が提案されている。例えば、特表平10-502074号公報には、「少なくとも1種の高分子を含む溶液をウイルス滲過する方法であって、該溶液の総塩含有量が約0.2M〜関係塩による該溶液の飽和状態の範囲であることを特徴とする前記方法」が開示されている。このように塩濃度を高めることにより、滲過効率が向上するのは、タンパク質粒子自体の大きさの収縮、タンパク質粒子同士及びまたはタンパク質と膜との相互作用が減少するためと考えられる。ただし、特表平10-502074号公報において、上記効果を奏する塩濃度は0.2M以上、さらに0.8〜1.5Mの範囲が特に好ましいとしているように、生理的に等張な塩濃度を大きく上回る塩濃度が必要とされている。このため静脈注射あるいは筋肉注射により人体に投与する医薬品の場合は、滲過後に透析等によって塩濃度を生理的等張濃度まで低減させる操作が必須である。また、塩濃度を高めていくと、塩析によりタンパク質の溶解度が低下し、逆効果となる可能性もある。従って、種々の生物由来高分子溶液から不純物を、膜滲過により、高い効率すなわち高い滲過速度及び透過率で、安全に、分離・除去する方法が求められている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】医薬・医療の分野において、膜滲過法は、生物由来高分子溶液から滲過によりウイルス等の不純物を除去する手段として、目的とする生物由来高分子の変性・失活がないため、回収率が高く、他の精製法に比し、優れた方法である。しかし、不純物の効果的な除去と目的とする生物由来高分子の滲過効率、すなわち高い滲過速度及び透過率との両立が困難である。本発明の課題は生物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの含有量を低減させることにより、生物由来高分子中に混在しているウイルス等の不純物の効果的な除去を維持しつつ、かつ、高い滲過効率を得る方法を提供することである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、滲過すべき生

物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの濃度を低減させた後、膜ろ過することを特徴とする膜ろ過による生物由来高分子溶液精製方法である。また、本発明は膜ろ過により除去すべき対象がウイルスである生物由来高分子溶液精製方法である。本発明におけるろ過すべき生物由来高分子溶液中のDNA及び／またはRNAの濃度は、5ppb以下に低減させ、これを膜ろ過することが好ましい。

【0009】本発明で用いられる生物由来高分子の起源は本発明の使用には無関係である。従って、ヒト、動物、植物、遺伝子組み替え又は細胞融合技術を使って培養細胞で生産されたあらゆる生物由来高分子である。本発明でいう生物由来高分子とは蛋白質及びポリペプチドである。本発明でいう蛋白質を例示すれば、血液凝固第VIII因子、同第IX因子、ヘモグロビン、フィブリノーゲン、アンチトロンビンIII、免疫ガンマグロブリン、アルブミン、インターフェロン、アポリポ蛋白質、及び成長ホルモンがあげられる。本発明でいう膜ろ過による除去対象となる不純物は、感染性ウイルス、細菌、真菌、原虫類、伝達性海綿状脳症病原因子である。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明において用いられるろ過膜は1 $\mu$ m以下好ましくは100nm以下の平均孔径を有する精密ろ過膜(Micro-filtration membrane)、限外ろ過膜(Ultra-filtration membrane)、ウイルス除去膜等である。本発明に用いるろ過膜の素材は、水溶性溶液をろ過できる物であれば、どんな素材でも良い。例えば、セルロース、セルロースアセテート、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリロニトリル、ナイロン等であるが、これに限定されるものではない。その中でも、セルロースを素材としたものは親水性であることから、水溶液の透過速度が高く、タンパク質の吸着が少なく、その透過に適しており望ましい。生物由来高分子溶液からのウイルス等の不純物分離用途に用いられるろ過膜を例示すれば、旭化成工業株式会社製のPlanova 35N及びPlanova 15N(いずれも素材は再生セルロース)、Millipore社製のViresolve 70、Vipresolve 180(いずれも素材はポリフッ化ビニリデン)、住友電工社製のフロロポア膜(素材は4フッ化エチレン)、コーニングコスター社製ニュクリポアー膜(素材はポリカーボネート)などがあげられる。

【0011】本発明に用いるろ過膜の形態は、平膜、中空糸膜、スパイラル膜、ブリーツ状膜等いかなる形態を有していてもよい。また、ろ過の形式はdead end方式、tangential flow方式のいずれでも適用可能である。

【0012】本発明に適した生物由来高分子溶液の濃度は種類によって違うが、例えば、ガンマグロブリン溶液の場合、0.05～10%である。好ましくは3～8%であ

る。10%以下であるのはそれ以上の濃度では、ガンマグロブリンの分子同士の会合が高まり、本発明を用いてもろ過が非常に困難になるためである。一般にグロブリン溶液の濃度は高ければ高いほどDNA及びまたはRNAが介在した会合の可能性も高くなり、DNA及びまたはRNA除去による透過効率向上の効果が現れやすいので好ましい。

【0013】本発明を実施する際の生物由来高分子溶液の温度及びpHは生物由来高分子が変性しない範囲であることが望ましい。例えば、ガンマグロブリン溶液の場合、通常、溶液の温度は2℃～25℃でpHは約7～8の範囲が望ましい。

【0014】溶液中のDNA及びまたはRNAの測定に関しては、従来PCR法、紫外線可視分光光度法、蛍光法が使われてきた。PCR法においては、その検出限界は例えば入フェージDNAの場合、約10ppmである(バイオ総合カタログ1997/1998 vol.1 遺伝子工学、D-17、宝酒造株式会社)。また、紫外線可視分光光度法においては1.0ppm程度とされている(A. Higuchi et al. J. Membrane Sci., 116, 191(1996))。また、エチレンブロマイド(インターカレート剤)を用いた蛍光測定法では、約0.1ppmである。しかし、最近新たに開発された新しい蛍光プローブ(BEACON V2165, DNA QUANTITATION KIT、宝酒造株式会社製)を用いた蛍光測定法では、検出限界を0.5ppb以下にすることが可能となった(R. Bolger et al. Biotechniques, 23, 532(1997))。

【0015】生物由来高分子の産生は生体ないしは細胞により行われるので、通常、精製前の生物由来高分子溶液には、DNA及びまたはRNAが不可避免的に含有されている。例えば、シグマ社製凍結乾燥ガンマグロブリン(G-5009、牛由来)を緩衝液に溶解し、5000ppm(0.5%)の水溶液を調製し、この時のDNA濃度を測定したところ、8 $\pm$ 2ppbであった。また、Life Technologies社製凍結ガンマグロブリン(197-7000、牛由来)を溶解して得た5%溶液中のDNA濃度を測定したところ、37 $\pm$ 4ppbであった。

【0016】溶液中のDNA及びまたはRNA濃度を低減させる方法としては制限酵素法、アフィニティークロマトグラフ法、イオン交換法、膜ろ過にて除去する方法などが知られている。また、凝集剤を添加することにより、DNA及びまたはRNAを沈殿させ遠心分離で分離する方法が報告されている。例えば、キトサンのように静電的な相互作用で凝集させるもの(特開昭63-56300号公報)がある。本発明に従って、生物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの濃度を低減した後、適切に選択された膜を用いて膜ろ過を行えば、効果的な不純物除去と同時に、従来の方法に比し、著しく効率的なろ過が実現される。

【0017】DNA及び／またはRNAを含有する生物由来高分子溶液を膜ろ過する場合、DNA及びまたはRNAの介在に

より、生物由来高分子が会合し、その粒子サイズが大きくなり、膜細孔を通過しにくくなるため、滲過効率すなわち滲過速度、透過率が低下する。また、滲過を継続すると、時間の経過に伴い、膜表面及び膜内部の細孔が閉塞していき、滲過効率は通常さらに低下するが、会合による生物由来高分子粒子の巨大化により、この傾向が加速される。会合を促進するDNA及び/またはRNAの濃度を低減させた後、膜滲過することにより、これらの現象を解消することができる。

【0018】滲過効率の改善効果が発現する生物由来高分子溶液中のDNA及びまたはRNAの除去のレベルは、生物由来高分子物質の種類、温度、pH等の、溶液の性状、滲過膜の種類によって異なるが、原液濃度に対する除去率は、好ましくは10%以上の範囲であり、より好ましくは20%以上の範囲である。さらに好ましくは40%以上の範囲である。例えば、ガンマグロブリンの場合、DNA除去率15~50%の範囲でDNA除去を行った後（除去後のDNA濃度は20ppb~4ppbの範囲）、膜滲過を行ったところ、DNA除去を行わない場合に比し、滲過効率の向上が見られた。DNA濃度を5 ppb 以下まで低減した場合には滲過効率の向上が著しく、かつ、DNA除去から不純物除去までの時間の経過に関して、向上効果が持続した。さらに、不純物除去後の溶液中の不純物再発生による白濁現象が抑制できた。

【0019】

【実施例】次に実施例によってこの発明をさらに具体的に説明する。

【実施例1】ガンマグロブリン（シグマ社製、G-5009、牛由来）をトリスアミノメタン塩酸塩(5mM/l) /エチレンジアミン-4酢酸-2ナトリウム (0.5mM/l)緩衝液に溶解し、酢酸を添加してpH8.0 の 5000ppmガンマグロブリン水溶液を調製した。このガンマグロブリン水溶液 3mlに、Beacon DNA Quantitation Kit (V2165, PanVer a Corporation製、宝酒造株式会社より購入)中の蛍光プローブを30 $\mu$ l 添加した。励起波長 485nm, 蛍光波長 530nm (日本分光製、分光蛍光光度計FP-777使用)の条件下で、ガンマグロブリン水溶液中のDNA濃度を、DNAにインターカレートされた蛍光プローブの蛍光強度より定量した。この時のDNA濃度は、8 $\pm$ 2ppb であった。

【0020】次に孔径 1.0 $\mu$ m、膜面積 17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜 (FP-100, 住友電工社製)を限外ろ過装置 (RP-1, UHP-43K, アドバンテック社製)に取り付け、上記により調製したガンマグロブリン水溶液を圧力0.3気圧、25℃の条件下で滲過して、DNA除去操作を行った。膜を透過してきた透過液 3mlを採取し、上記と同様な方法でDNA濃度を定量した。この時の値は、4.5ppbであった。すなわち、この場合のDNA除去率は43.8%であった。

【0021】孔径 0.1 $\mu$ m、膜面積 17.3cm<sup>2</sup>のニュクリポア膜 (111105, コーニングコスター社製、微生物除

去フィルター)を限外ろ過装置 (RP-1, UHP-43K, アドバンテック社製)に取り付けた後、上記DNA濃度4.5ppbのガンマグロブリン水溶液を圧力0.3 気圧、25℃の条件下で滲過した。透過液40g 採取後におけるガンマグロブリンの透過率は、84.9 $\pm$ 2%であった。また、透過液40g 採取後における透過速度は、16.3リットル/m<sup>2</sup>/hrであった。ここで、ガンマグロブリンの透過率は以下のように定義した。

透過率 (%) = ((透過液中のガンマグロブリン濃度) / (原液中のガンマグロブリン濃度))  $\times$  100

【0022】

【比較例1】実施例1と同様にして、5000ppm ガンマグロブリン水溶液 (pH8.0)を調製した。実施例1で行なったDNA除去の操作を行わずに、8 $\pm$ 2ppb DNAを含有する状態で、孔径0.1 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のニュクリポア膜 (111105, コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を用いて実施例1と同様な方法で滲過した。透過液40g採取後におけるガンマグロブリンの透過率は、60.0 $\pm$ 5%であった。この値は、実施例1の透過液40g採取後におけるガンマグロブリンの透過率に比べて、著しく減少していた。また、透過速度は、透過液40g採取後、11.6リットル/m<sup>2</sup>/hrであった。この値は、実施例1の約7割の透過速度である。

【0023】

【実施例2~5】実施例1と同様にして、5000ppm ガンマグロブリン水溶液(pH8.0)を調製した。DNA除去の操作は、以下に示す条件で行なった。実施例2では、孔径 0.1 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のニュクリポア膜 (111105, コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を限外ろ過装置(RP-1、UHP-43K、アドバンテック社製)に取り付け、上記により調製したガンマグロブリン水溶液を圧力0.3 気圧、25℃の条件下で滲過して、DNA除去操作を行なった。この時のDNA値は、0.5ppbであった。すなわち、この場合のDNA除去率は93.8%であった。

【0024】実施例3では、孔径0.22 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜(FP-022、住友電工社製)を用いて実施例2の限外ろ過条件にて2回滲過して、DNA除去操作を行なった。この時のDNA値は、0.75ppb であった。すなわち、この場合のDNA除去率は90.6%であった。

【0025】実施例4では、孔径1.0  $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜(FP-100,住友電工社製)を用いて実施例2の限外ろ過条件にて2回滲過した。さらに、孔径 0.22 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜(FP-022,住友電工社製)を用いて実施例2の限外ろ過条件にて1回滲過して、DNA除去操作を行なった。この時のDNA値は、1.00ppb であった。すなわち、この場合のDNA除去率は87.5%であった。

【0026】実施例5では、孔径1.0  $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜(FP-100,住友電工社製)を用いて実

実施例2の限外濾過条件にて2回濾過して、DNA除去操作を行なった。この時のDNA値は、2.50ppbであった。すなわち、この場合のDNA除去率は68.8%であった。

【0027】これらの実施例2～5のガンマグロブリン水溶液を原液として、孔径0.1  $\mu\text{m}$ 、膜面積17.3 $\text{cm}^2$ のニュクリポアー膜(111105、コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を用いて実施例1と同様な方法で、圧力0.3気圧、25℃の条件下で限外濾過した。透過

液40g採取後におけるガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した結果を表1に示す。実施例2では、透過液と原液のガンマグロブリン濃度は誤差範囲内で一致していた。また、実施例2の透過速度は、pH8.0の緩衝液を孔径0.1  $\mu\text{m}$ の膜を用いて限外濾過させた時の透過速度279リットル/ $\text{m}^2$ /hrの45%と高透過性であった。

【0028】

【表1】

実施例2～5のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

実施例 No.	ガンマグロブリン水溶液中の		ガンマグロブリンの	
	DNA濃度 (除去後) [ppb]	DNA除去率 (%)	透過率 (%)	透過速度 ( $\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$ )
2	0.50	93.8	99.5 $\pm$ 0.5	127
3	0.75	90.6	98.1 $\pm$ 1	97.
4	1.00	87.5	97.5 $\pm$ 1	63.9
5	2.50	68.8	95.9 $\pm$ 1	37.9

【0029】

【比較例2】実施例2で調製した0.5ppbDNAを含有する5000ppmガンマグロブリン水溶液にDNA(シグマ社製、Cal f Thymus, Type I)を添加して、最終DNA濃度を8ppbに調製した。この8ppbDNA含有ガンマグロブリン水溶液を原液として、孔径0.1  $\mu\text{m}$ 、膜面積17.3 $\text{cm}^2$ のニュクリポアー膜(111105、コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を用いて実施例1と同様な方法を用いて、圧力0.3気圧、25℃の条件下で限外濾過した。透過液40g採取後におけるガンマグロブリンの透過速度は、12.3リットル/ $\text{m}^2$ /hrであった。この値は、比較例1とほぼ同等な透過速度であった。さらに、実施例2の透過速度の1/10の値であった。すなわち、DNAが原液中に含まれていると透過速度は著しく低下することが明らかである。

【0030】

【実施例6】実施例5と同様にして、DNAを一部除去した5000ppmガンマグロブリン水溶液(pH8.0、DNA濃度2.5ppb)を調製した。このガンマグロブリン水溶液を原液として、孔径0.1  $\mu\text{m}$ 、膜面積17.3 $\text{cm}^2$ のフクロボア膜(FP-010、住友電工社製)を用いて実施例1と同様な方法により、圧力0.3気圧、25℃の条件下で限外濾過した。透過液を10gずつ採取して、透過液No.を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。この結果を表2に示す。pH8.0の緩衝液を上記フクロボア膜を用いて濾過させた時の透過速度は、608リットル/ $\text{m}^2$ /hrであるため、表2で示された透過速度は、緩衝液を用いた場合の65%以上と高透過性であった。

【0031】

【表2】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 ( $\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$ )
1	10	97.5 $\pm$ 1	406
2	20	95.9 $\pm$ 1	517
3	30	96.2 $\pm$ 1	488
4	40	96.0 $\pm$ 1	467
5	50	96.2 $\pm$ 1	442
13	130	96.2 $\pm$ 1	421

## 【0032】

【比較例3】比較例1と同様にして、DNA除去を行わなかった5000ppm ガンマグロブリン水溶液 (pH8.0, 8 ± 2ppb DNA含有) を調製した。このガンマグロブリン水溶液を原液として、孔径 0.1 $\mu$ m のフロロポア膜 (FP-010、住友電工社製) を用いて実施例1と同様な方法を用いて、圧力 0.3気圧、25℃の条件下で限外ろ過した。透過液を10g づつ採取して、透過液 No. を1から順

に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。この結果を表3に示す。表3の透過液130g採取後の透過速度は、実施例6における透過液130g採取後の透過速度の1/5であった。また、ガンマグロブリンの透過率は、実施例6の透過率に比べて著しく減少していた。

## 【0033】

## 【表3】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
1	10	72.8±1	314
2	20	74.4±1	273
3	30	75.6±1	213
4	40	74.7±1	173
5	50	75.2±1	150
13	130	75.3±1	33.8

## 【0034】

【実施例7】5%ガンマグロブリン溶液 (Life Technologies社製、197-7000、牛由来) を25℃にて放置して、解凍した。このガンマグロブリン溶液中のDNA濃度を実施例1と同様に定量した。この時のDNA濃度は、37 ± 4ppbであった。次に孔径0.22 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup> のニュクリポア膜 (111106、コーニングコスター社製) を限外ろ過装置 (RP-1, UHP-43K, アドバンテック社製) に取り付け、上記より調製したガンマグロブリン水溶液を圧力0.3 気圧、25℃の条件下でろ過し、DNA除去操作を行った。その後、この透過液を生理食塩水で3%ガンマグロブリン溶液に希釈した。この溶液3mlを採取し、実施例1と同様な方法でDNA濃度を定量した所、

18.5 ppbであった。すなわち、この場合のDNA除去率は15.9%であった。

【0035】孔径 0.1 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup> フロロポア膜 (FP-010、住友電工社製) を限外ろ過装置 (RP-1, UHP-43K, アドバンテック社製) に取り付け、上記DNA濃度 18.5ppb含有のガンマグロブリン溶液を圧力 0.3 気圧、25℃の条件下でろ過した。透過液を10g づつ採取して、透過液 No. を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。この結果を表4に示す。

## 【0036】

## 【表4】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
1	10	99.5 ±1	413
2	20	98.7 ±1	370
4	40	98.5 ±1	344
6	60	98.7 ±1	302
8	80	98.7 ±1	272
10	100	98.5 ±1	243
13	130	97.1 ±1	210

## 【0037】

【実施例8】実施例7と同様にして、5%ガンマグロブリン水溶液に解凍した。実施例7で行なったDNA除去の操作を数回行い、その後このガンマグロブリン溶液を生理食塩水で3%ガンマグロブリン溶液に希釈した。このとき実施例1で行なったDNA定量法により、3%ガンマグロブリン溶液中にDNAが4.8ppb含まれていることが明らかとなった。すなわち、この場合のDNA除去率は78.2%であった。このガンマグロブリン水溶液を

原液として、孔径0.1 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜 (FP-010、住友電工社製) を用いて実施例1と同様な方法により、圧力0.3気圧、25℃の条件下で限外濾過した。透過液を10gずつ採取して、透過液No.を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。この結果を表5に示す。

## 【0038】

## 【表5】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
2	10	94.0 $\pm$ 1	620
4	20	90.6 $\pm$ 1	620
6	30	90.6 $\pm$ 1	580
8	40	99.0 $\pm$ 1	580
10	50	97.4 $\pm$ 1	583
12	60	100 $\pm$ 1	583

## 【0039】

【比較例4】実施例7と同様にして、5%ガンマグロブリン水溶液に解凍した。実施例7で行なったDNA除去の操作を行わずに、そのまま、5%ガンマグロブリン溶液を生理食塩水で3%ガンマグロブリン溶液に希釈した。このとき実施例1で行なったDNA定量法により、3%ガンマグロブリン溶液中にDNAが22 $\pm$ 2ppb含まれていることが明らかとなった。このガンマグロブリン溶液を原液として、孔径0.1 $\mu$ m、膜面積17.3cm<sup>2</sup>のフロロポア膜 (FP-010、住友電工社製) を用いて、実施例7

と同様な方法で濾過した。この時、透過液を10gずつ採取して、透過液No.を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。結果を表6に示す。透過液40g採取後の透過速度は、実施例7及び実施例8における透過液40g採取後の透過速度のそれぞれ1/6、1/10であった。また、表6のガンマグロブリンの透過率は、実施例7及び実施例8の透過率に比べて減少していた。

## 【0040】

## 【表6】



各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
1	10	93.8±1	207
2	20	93.5±1	111
4	40	91.2±1	59.5
6	60	94.2±1	43.1
8	80	94.7±1	35.5
10	100	96.2±1	30.2
12	120	96.2±1	27.0
13	130	94.5±1	26.2

## 【0041】

【実施例9】実施例8と同様にして、DNAを除去した3%ガンマグロブリン溶液（DNA濃度 4.96ppbを調製した。すなわち、この場合のDNA除去率は86.6%であった。このガンマグロブリン水溶液を原液として、ウイルス除去用フィルター、PLANOVA 35N（旭化成工業株式会社製、有効膜面積0.001m<sup>2</sup>）を用いて実施例7と同様な方

法により圧力0.3気圧、25℃の条件下で、デッドエンド法による透過を行なった。透過液を5gずつ採取して、透過液 No. を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率率並びに透過速度を測定した。この結果を表7に示す。

## 【0042】

## 【表7】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
2	10	82.5±1	26.5
4	20	87.6±1	28.4
6	30	90.6±1	28.5
8	40	91.5±1	30.5
10	50	94.5±1	33.9
12	60	97.9±1	35.4

## 【0043】

【実施例10】実施例7と同様にして、5%ガンマグロブリン水溶液に解凍した。このガンマグロブリン水溶液を原液として、ウイルス除去用フィルター、PLANOVA 75N（旭化成工業株式会社製、有効膜面積0.001m<sup>2</sup>）を用いて実施例9と同様な方法により圧力 0.3気圧、25℃の条件下で、デッドエンド法による透過を行なった。その後このガンマグロブリン溶液を生理食塩水で3%ガンマグロブリン溶液に希釈した。このとき実施例1で行なったDNA定量法により、3%ガンマグロブリン溶液中にDNAが19.0 ppb含まれていることが明らかとなった。すな

わち、この場合のDNA除去率は13.6%であった。このガンマグロブリン水溶液を原液として、ウイルス除去用フィルター、PLANOVA 35N（旭化成工業株式会社製、有効膜面積0.001m<sup>2</sup>）を用いて実施例9と同様な方法により圧力 0.3気圧、25℃の条件下で、デッドエンド法による透過を行なった。透過液を5gずつ採取して、透過液 No. を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率率並びに透過速度を測定した。この結果を表8に示す。

## 【0044】

## 【表8】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
2	10	80.8±1	27.4
4	20	88.5±1	27.2
6	30	94.8±1	28.4
8	40	95.8±1	25.4
10	50	93.0±1	25.0
12	60	96.6±1	29.6

## 【0045】

【比較例5】比較例3と同様にして、DNA除去を行わなかった3%ガンマグロブリン溶液(22±2ppbDNA含有)を調製した。このガンマグロブリン水溶液を原液として、ウイルス除去用フィルター、PLANOVA 35N(旭化成工業株式会社株製、有効膜面積0.001m<sup>2</sup>)を用いて実施例9と同様な方法により圧力 0.3気圧、25℃の条件下

で、デッドエンド法による限外ろ過を行なった。透過液を5gずつ採取して、透過液 No. を1から順に番号を振った。この透過液に対するガンマグロブリンの透過率並びに透過速度を測定した。この結果を表9に示す。

## 【0046】

【表9】

各透過液採取液中のガンマグロブリンの透過率並びに透過速度

透過液 No.	透過液総量 (g)	ガンマグロブリン の透過率 (%)	透過速度 (L/m <sup>2</sup> /hr)
2	10	74.9±1	24.4
3	15	80.1±1	18.0
4	20	92.9±1	12.0
5	25	78.0±1	5.3
6	30	77.8±1	1.2
7	35	80.4±1	0.2

【0047】透過液 35g採取後の透過速度は、非常に遅く、測定不可能であった。透過液 30g採取後の透過速度は、実施例9における透過液 30g採取後の透過速度の1/24であり、実施例10における透過液 30g採取後の透過速度の1/22であった。また、表9のガンマグロブリンの透過率は、実施例9並びに実施例10の透過率に比べて減少していた。

## 【0048】

【実施例11】実施例10におけるガンマグロブリン水溶液に、ブタ日本脳炎ウイルスを加え、実施例10に従って、10gの溶液(原液)をろ過し、透過液を採取し

た。これを実験Aとする。比較例6におけるガンマグロブリン水溶液に、ブタ日本脳炎ウイルスを加え、比較例6に従って、10gの溶液(原液)をろ過し、透過液を採取した。これを実験Bとする。ろ過前の水溶液(原液)は実験A及び実験Bのいずれについても、その中のウイルスの感染力価はいずれも8.2logであった。ろ過前の水溶液(原液)中及び透過液中のウイルスの感染力価を分析し、以下の結果を得た。

## 【0049】

【表10】

## 膜透過によるウイルス除去率

実 験	ウイルス除去率 (LRV)
A	5.8
B	5.8

【0050】ただし、表10におけるウイルス除去率 (LRV)は下記の定義によった。LRV =  $-\log$  ((透過液中のウイルス感染力価) / (原液中のウイルス感染力価)) 上記結果はウイルス安全性に関する規制当局のガイドラインを充分満たすものであり、本発明によっても、従来の方法と同様に効率でのウイルス除去が可能である。

【0051】

【実施例12】比較例1と同様にして、pH5 の5000ppm ガンマグロブリン水溶液を200ml 調製した。この水溶液を陰イオン交換樹脂 (SP Sepharose HP, アマシャム ファルマシアバイオテック社製) 75ml と共に1リットルフラスコに添加した。24時間、15℃の恒温槽中で撹拌した。その後、撹拌をやめ、陰イオン交換樹脂をデカンデーションにより取り除いた。上記のDNA 除去操作後、5000ppm ガンマグロブリン水溶液中のDNA濃度は、実施例1で測定したDNA定量法により1ppb以下であることを確認した。上記ガンマグロブリン水溶液をpH8に調整した後、孔径0.1  $\mu$ m のフロロポア膜 (FP-010, 住友電工製) を用いて実施例6と同様に濾過した。透過液 40g採取後における透過速度は 300リットル/ $\text{m}^2$ /hrであり、比較例2の1.7 倍の透過流量の上昇が観察された。また、ガンマグロブリンの透過率も93.5 $\pm$ 1 %であり、比較例2と比べて上昇していた。

【0052】

【実施例13】ガンマグロブリン (シグマ社製、G-5009、牛由来) をRNA、DNA及び蛋白質単離用試薬であるISOGEN (311-02501、ニッポンジーン社製) に溶解した。その後、クロロホルムを添加して、遠心分離した。RNAが含まれている水相を除去し、残った中間相並びに有機相にエタノールを加え、ホモジナイズした。再度遠心分離して、上清液を抽出した (沈殿物中にDNA残留)。この上清液にイソプロパノールを添加して再度遠心分離した。沈殿物をイソプロパノールにより洗浄して、真空乾燥させた。以上の操作によりガンマグロブリンの回収率は、83%であった。実施例1と同様にして、上記の方法によりDNAを除去したガンマグロブリンを用いて、5000ppmガンマグロブリン水溶液 (pH8.0) を調製した。

【0053】このガンマグロブリン水溶液中のDNA濃度は、実施例1で測定したDNA定量法により1ppb以下であることを確認した。このガンマグロブリン水溶液を

原液として、孔径 0.1  $\mu$ m、膜面積17.3 $\text{cm}^2$  のフロロポア膜 (FP-010、住友電工社製) を用いて実施例1と同様な方法を用いて、圧力 0.3気圧、25℃の条件下で濾過した。透過液 40g採取後における透過速度は 529リットル/ $\text{m}^2$ /hrであり、比較例2の 3.1倍の透過速度の上昇が観察された。また、ガンマグロブリンの透過率も96.5 $\pm$ 1%であり、比較例2と比べて上昇していた。

【0054】

【実施例14】実施例1と同様にして、5000ppm ガンマグロブリン水溶液 (pH8.0) を調製した。Bovine pancreatic DNase I (シグマ社製) を100ng/mlの濃度となるように上記ガンマグロブリン水溶液中に加えた。その後、37℃の恒温槽中で72時間撹拌し、DNAを消化させた。上記の操作後、5000ppm ガンマグロブリン水溶液中のDNA濃度は、実施例1で測定したDNA定量法により1ppb以下であることを確認した。その後、孔径 0.1  $\mu$ m のフロロポア膜 (FP-010、住友電工製) を用いて実施例6と同様に濾過した。透過液 40g採取後における透過速度は 405リットル/ $\text{m}^2$ /hrであり、比較例2の 2.3倍の透過速度の上昇が観察された。また、ガンマグロブリンの透過率も95.5 $\pm$ 1%であり、比較例2と比べて上昇していた。

【0055】以上より明らかなようにタンパク質 (ガンマグロブリン) 溶液中のDNAが減少することにより、タンパク質溶液を膜濾過する時、透過速度が増大し、さらに、蛋白質の透過率が顕著に上昇していた。

【0056】

【実施例15】実施例1と同様にして5000ppb ガンマグロブリン水溶液 (pH8.0) を調製した。これに、RNA transcript (luc gene) を添加して12 $\pm$ 2 ppb の RNA含有ガンマグロブリン水溶液を調製した。Beacon DNA Quantitation Kit (V2165, Pan Vera Corporation 製、宝酒造株式会社より購入) を用いて、RNA transcript (luc gene) を試量として RNA濃度に対する蛍光強度の検量線を作成した。この検量線を用いて上記で調製したガンマグロブリン水溶液中の RNA濃度を定量したところ、ガンマグロブリン水溶液中には12 $\pm$ 2 ppb の RNAが含まれていることが定量された。

【0057】次に孔径0.22  $\mu$ m、膜面積17.3 $\text{cm}^2$  のフロロポア膜 (FP-022、住友電工社製) を限外濾過装置 (RP-1, UHP-43K, アドバンテック社製) に取り付け、上記により調製したガンマグロブリン水溶液を圧力0.3 気圧、25

℃の条件下で滲過して、RNA除去操作を行なった。膜を透過してきた透過液 3ml を採取し、上記と同様な方法で RNA 濃度を定量した。この時の値は、 $5 \pm 1$ ppb であった。

【0058】この含有ガンマグロブリン水溶液を原液として、孔径  $0.1 \mu\text{m}$ 、膜面積  $17.3\text{cm}^2$  のニュクリポアー膜(111105、コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を用いて実施例1と同様な方法を用いて、圧力  $0.3 \text{ 気圧}$ 、 $25^\circ\text{C}$  の条件下で限外滲過した。透過液 40g 採取後におけるガンマグロブリンの透過速度は、 $14.8 \text{ リットル}/\text{m}^2/\text{hr}$  であり、ガンマグロブリンの透過率は  $90.5\%$  であった。

【0059】

【比較例5】実施例15と同様にして、 $12 \pm 2$  ppb 含有している  $5000\text{ppm}$  ガンマグロブリン水溶液( $\text{pH}8.0$ )を調製した。実施例15で行なった RNA 除去の操作を行なわ

ずに、 $12 \pm 2$  ppbRNA を含有する状態で、孔径  $0.1 \mu\text{m}$ 、膜面積  $17.3\text{cm}^2$  のニュクリポアー膜(111105、コーニングコスター社製、微生物除去フィルター)を用いて実施例1と同様な方法で滲過した。透過液 40g 採取後におけるガンマグロブリンの透過率は、 $74.3 \pm 5\%$  であった。この値は、実施例15の透過液 40g 採取後におけるガンマグロブリンの透過率に比べて、著しく減少していた。また、透過速度は、透過液 40g 採取後、 $12.5 \text{ リットル}/\text{m}^2/\text{hr}$  であった。この値は、実施例15の  $84\%$  の透過速度である。

【0060】

【発明の効果】本発明の方法によれば、生物由来高分子溶液から滲過により、ウイルス等の不純物を除去するに際し、従来の方法に比較して、滲過効率、すなわち滲過速度及び透過率が向上し、これにより、生産効率が向上し、製造コストが低減できる。